

SINTESIS TURUNAN SENYAWA ANDROGRAFOLIDA MELALUI REAKSI ESTERIFIKASI DENGAN BAHAN ASAM 2-KLOROBENZOAT

SYNTHESIS OF DERIVATE ANDROGRAFOLIDA THROUGH ESTERIFICATION REACTIONS WITH 2-KLOROBENZOAT ACID

Andrianopsyah Mas Jaya Putra^{1,2}, Hilwa Lutfia¹

¹ Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Sunter Agung Podomoro, Jakarta Utara

²Laboratorium Pusat Penelitian Kimia (PP KIMIA)-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) kawasan PUSPITEK, Serpong Tangerang Selatan.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mencari atau menemukan kondisi optimum dengan menggunakan reaksi esterifikasi terhadap sintesis turunan senyawa andrografolida. Reaksi esterifikasi ini menggunakan senyawa andrografolida, senyawa N,N-disikloheksilkarbodiimida (DCC) sebagai aktivator, senyawa N,N-4-dimetil amino piridin (DMAP) sebagai katalis, asam 2- klorobenzoat, dan diklorometana sebagai pelarut. Reaksi esterifikasi ini dilakukan secara semalaman (*overnight*) pada suhu kamar (rt). Senyawa hasil sintesis dilakukan identifikasi senyawa dengan kromatografi lapis tipis (KLT), kemudian dilakukan kromatografi kolom, yang selanjutnya dilakukan karakterisasi turunan senyawa dengan menggunakan spektroskopi LC-MS. Setelah didapatkan hasil analisis dengan menggunakan spektroskopi LC-MS kemudian dilakukan penafsiran data MS dengan menggunakan *software MS interpreter 2.0*.

Kata kunci : Senyawa turunan andrografolida

ABSTRACT

This research is aimed at finding out the optimum condition using esterification reaction toward derivatives synthesis of andrographolide compound. This esterification used andrographolide compound, N,N- dicyclohexylcarbodiimide (DCC) compound as activator, compound of N,N-4- dimethylaminopyridine (DMAP) as catalyst, acid 2-chlorobenzoic and dichloromethane as solvent. This esterification reaction was conducted overnight on room-temperature (rt). Identification of compound using thin-layer chromatography (KLT), column chromatography and characterization of compound derivatives using spectroscopic LC-MS was conducted to synthetic compounds. After analyses result gained using spectroscopic LC-MS, database MS interpretation was performed using MS interpreter 2.0 software.

Keyword: Andrographolide derivatives compound

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* yang hidup dan berkembang biak dalam sel darah merah manusia, ditularkan oleh nyamuk malaria (*Anopheles*) betina, dapat menyerang semua orang baik laki-laki ataupun perempuan pada semua golongan umur dari bayi, anak-anak dan orang dewasa

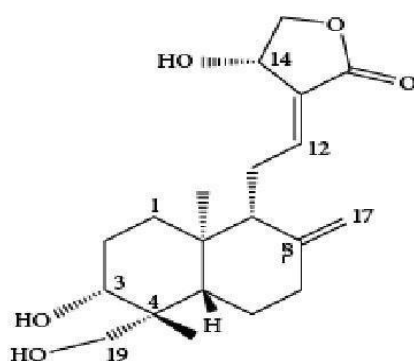
(Kemenkes RI, 2014). Gejala awal dari penyakit ini seperti gejala demam, sakit kepala, menggigil, dan muntah-muntah (Soedarto, 2011).

Malaria disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium*. Pada manusia *Plasmodium* terdiri dari 4 spesies, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium ovale*. Akan tetapi jenis spesies *Plasmodium falciparum* merupakan penyebab infeksi berat bahkan dapat menimbulkan kematian (Harijanto, dkk 2010).

Sejak beberapa tahun lalu telah ditemukan kejadian resistensi *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* terhadap klorokuin (Karyana, 2008), tetapi pengobatan malaria dengan klorokuin masih digunakan di Indonesia. Kasus resistensi terhadap sulfadoksin pirimetamin, dan artemisinin juga sudah pernah dilaporkan (Noviyanti, 2011).

Salah satu pemecahan masalah malaria adalah mencari alternatif pengobatan yang berasal dari tanaman herbal yang banyak tumbuh di Indonesia. Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan tanaman menahun, dengan tinggi mencapai 1-3 kaki. Semua bagian tanaman *Andrographis paniculata*, seperti daun, batang, bunga, dan akar, memiliki rasa sangat pahit. Bagian tanaman yang sering digunakan dalam pengobatan adalah seluruh bagian tanaman di atas tanah (herba). Secara umum *Andrographis paniculata* mengandung diterpen lakton, dan flavonoid (Akbar, 2011).

Kandungan flavonoidnya terutama terdapat pada bagian akar, namun dapat pula diisolasi dari daun. Selain itu, herba ini juga mengandung alkana, keton, dan aldehida. Andrografolid merupakan diterpenoid lakton, berupa kristal bening dan mempunyai rasa yang sangat pahit (Chao dan Lin, 2010) dengan rumus molekul andrografolid Andrografolida memiliki aktivitas moderat (1-25 μM), batas atas antara aktivitas moderat ke tinggi yaitu 10x lipat lebih kecil dari 25 μM .



Gambar 1. Struktur kimia andrografolid (DepkesRI, 2008)

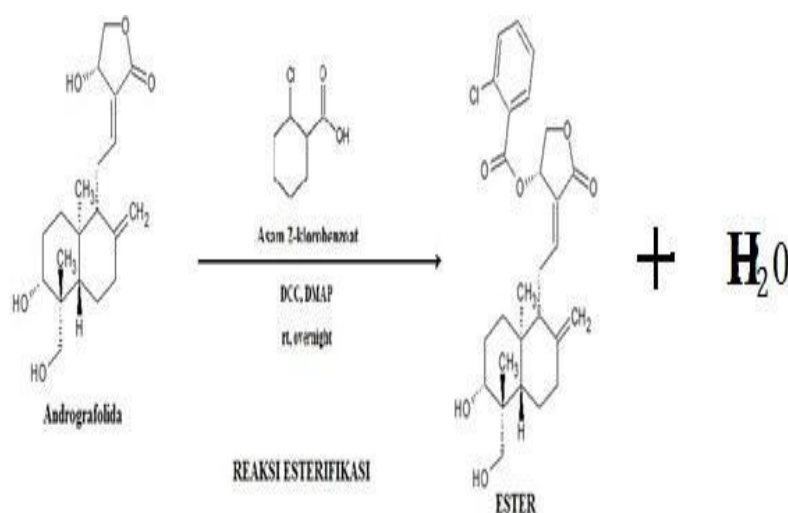
Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas maka penelitian ini bertujuan untuk mencari atau menemukan kondisi optimum dengan menggunakan reaksi esterifikasi terhadap sintesis turunan senyawa andrografolida.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut, yaitu: timbangan analitik (Ohaus), spektrofotometer LC-MS, pH meter, tabung reaksi, *beaker glass*, labu ukur, gelas ukur, corong pisah, pengaduk *magnetic stirrer*, kromatografi kolom, bejana KLT, lampu UV, kertas saring, dan plat kromatografi lapis tipis. Bahan-bahan yang digunakan antara lain sebagai berikut senyawa andrografolida murni hasil sintesis, N,N- disikloheksil karbodiimida (DCC), 4- dimetil amino piridin (DMAP), aqua destilata, diklorometana, asam 2- klorobenzoat, NaCl, pelarut organik (metanol, etil asetat, heksan, aseton).

REAKSI ESTERIFIKASI

Reaksi esterifikasi merupakan reaksi yang terjadi antara suatu asam karboksilat dengan suatu alkohol membentuk suatu ester. Andrografolida memiliki gugus alkohol dan asam2-klorobenzoat yang memiliki gugus asam karboksilat. Reaksi ini dilakukan semalaman (overnight) pada suhu kamar dengan menggunakan DCC (N,N-disikloheksilkarbodiimida) sebagai *activator* dan DMAP (N,N-4-dimetilamino piridin) sebagai katalis dengan pelarut diklorometana.



Gambar 2. Reaksi Esterifikasi Terhadap Andrografolida Ekstraksi

Pemisahan dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan NaCl jenuh dalam corong pisah. Dari pemisahan ini menghasilkan 2 fase yaitu fase air dan fase diklorometana. Fase diklorometana selanjutnya akan dilakukan identifikasi senyawa dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen etil asetat : heksan (4:1)/(v/v).

Pemisahan dan Pemurnian

Selanjutnya dilakukan pemisahan dan pemurnian menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam yaitu silika gel G 60 diameter (0,040-0,063 mm) dan fase gerak yaitu eluen etil asetat : heksan (4:1)/(v/v).

Karakterisasi Senyawa

Karakterisasi senyawa turunan andrografolida yang dihasilkan dari reaksi esterifikasi dilakukan dengan menggunakan spektroskopi LC-MS. *Liquid Chromatography-Mass Spectra* (LC-MS) merupakan kombinasi pemisahan antara kromatografi cair menggunakan deteksi spektrofotometri massa. Spektroskopi massa digunakan untuk menentukan bobot molekul dari senyawa tersebut setelah dilakukan reaksiesterifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Sintesis Andrografolida

Dalam penelitian ini, sebelum melakukan reaksi terlebih dahulu dilakukan pencucian alat dan penimbangan terhadap bahan-bahan yang akan digunakan seperti andrografolida (serbuk putih) kemudian N,N-disikloheksilkarbodiimida (DCC) berbentuk kristal putih, N,N-4-dimetil amino piridin (DMAP) berbentuk serbuk putih, dan asam 2-klorobenzoat (serbuk putih). Setelah itu, bahan yang telah ditimbang tadi dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian ditambahkan pelarut diklorometana menghasilkan larutan berwarna putih. Lalu dimasukkan stirrer atau pengaduk kedalam erlenmeyer. Kemudian erlenmeyer ditaruh diatas pengaduk magnetik dengan mengatur kecepatan pengadukan 6 rpm dan reaksi ini dilakukan pada suhu kamar (25°C) yang dilakukan semalaman (*overnight*).

Setelah dilakukan reaksi semalaman (*overnight*), hasil reaksi tersebut menghasilkan larutan berwarnaputih kekuningan (keruh) dimana larutan awal sebelum reaksi terjadi berwarna putih. Perubahan warna merupakan salah satu indikasi terjadinya reaksi.

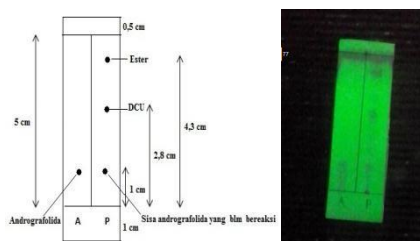
2. Identifikasi Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk memastikan apakah produk hasil reaksi esterifikasi sudah terbentuk atau tidak. Dilakukan identifikasi senyawa

andrografolida menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen etil asetat : heksan (4:1)/(v/v) selama 10 menit dalam keadaan bebas cahaya. Hasilnya adalah Rf dari andrografolida dan sisa dari andrografolida yang belum bereaksi yaitu 0,2, sedangkan Rf dari disikloheksil urea (DCU) yaitu 0,56 dan Rf dari ester yaitu 0,86.

3. Ekstraksi

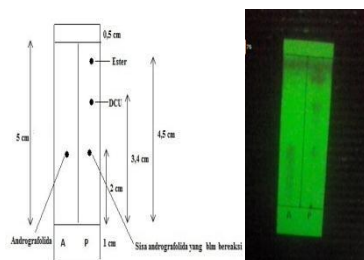
Setelah dilakukan identifikasi senyawa dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, maka dilakukan pemisahan dengan ekstraksi menggunakan NaCl jenuh pada corong pisah. NaCl jenuh berfungsi dalam proses salting out dimana penambahan larutan elektrolit kedalam fase air yang mengandung senyawa organik sehingga dengan penambahan larutan elektrolit ini (NaCl) difungsikan supaya kelarutan senyawa organik dalam air bisa menurun dan juga konsentrasi senyawa organik dalam fase organik akan lebih besar daripada fase air.



Gambar 3. Hasil spot KLT setelah reaksi esterifikasi

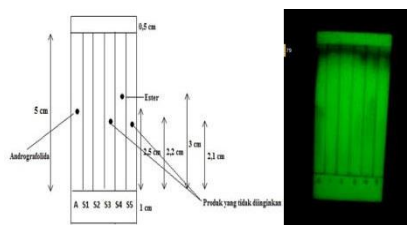
Proses ekstraksi dilakukan selama 10 menit menghasilkan 2 fase yaitu fase air dan fase diklorometana. Fase diklorometana terdapat dibawah karena berat molekul diklorometana jauh lebih besar daripada air (sehingga fase air terdapat diatas). Selanjutnya fase diklorometana tersebut dilakukan identifikasi senyawa dengan kromatografi lapis tipis untuk memastikan bahwa produk reaksi terdapat dalam fase tersebut dan dihitung Rfnya.

Berdasarkan penelitian ini, diperoleh spot andrografolida dan sisa andrografolida yang belum bereaksi dengan Rf yaitu 0,4; nilai Rf untuk diskloheksil urea (DCU) yaitu 0,68, dan nilai Rf untuk ester yaitu 0,9.



Gambar 4. Hasil spot KLT setelah ekstraksi

Selanjutnya fase diklorometana tersebut dievaporasi dengan menggunakan rotary evaporator pada kecepatan 120 rpm dengan titik didih diklorometana yaitu 39,6°C selama 10 menit.



Gambar 5. Hasil KLT kromatografi kolom

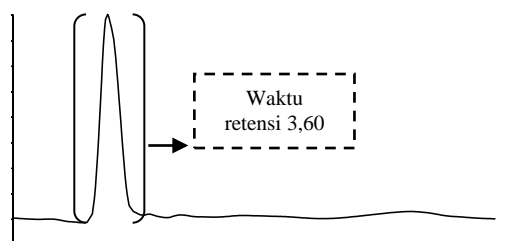
4. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Sintesis Andrografolida

Senyawa sintesis andrografolida yang sudah dipekatkan dengan *rotary evaporator* kemudian dipisahkan dan dimurnikan dengan kromatografi kolom dengan eluen etil asetat : heksan (4:1)/(v/v). Kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan fase diam yaitu silika gel 60 dengan diameter (0,040-0,063 mm) dan fase gerak yaitu pelarut etil asetat : heksan (4:1)/(v/v). Silika gel yang digunakan dibuat menjadi bubur terlebih dahulu, setelah itu bubur tersebut dimasukkan kedalam buret 1/3 kali panjang buret. Panjang buret yang digunakan yaitu 60 cm.

Setelah kolomnya sudah padat, baru ditambahkan sampel dengan panjang kolom 21 cm. Kemudian ditambahkan pelarut etil asetat : heksan (4:1)/(v/v) kedalam buret. Sampel hasil kolom ditampung kedalam tabung reaksi dengan laju alirnya 15 tetes tiap menit. Selanjutnya fraksi yang diperoleh dari hasil kromatografi kolom diidentifikasi kembali dengan kromatografi lapis tipis, karakterisasi senyawa sintesis andrografolida dengan LC-MS fraksi senyawa dari hasil pemurnian selanjutnya di karakterisasi dengan LC-MS. Metode yang digunakan dalam alat MS ini yaitu sistem ESI (*Electrospray Ionisation*). Metode ini hampir tidak terjadi fragmentasi berbeda dengan GC-MS. Tetapi bukan berarti tidak terjadi sama sekali jadi peluang

fragmentasinya tetap ada. Fragmentasi tetap ada tetapi ukuran fragmennya besar dan jumlahnya tidak banyak.

Data LC (*Liquid Chromatography*) LC MS –ESI pos ion Vol injection 2 ul Flow 0.05 ml/min



Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	3.60	2.8286	4.8501	261	4503
	618	7	50		.68

Gambar 6. Data LC (*Liquid Chromatography*)

Collumn C-18 (15mm x 1 mm) *Eluent* MeOH untuk memastikan kemurnian senyawa tersebut. Dari hasil KLT, diperoleh bahwa fraksi hasil kromatografi kolom merupakan senyawa sintesis andrografolida yang murni.

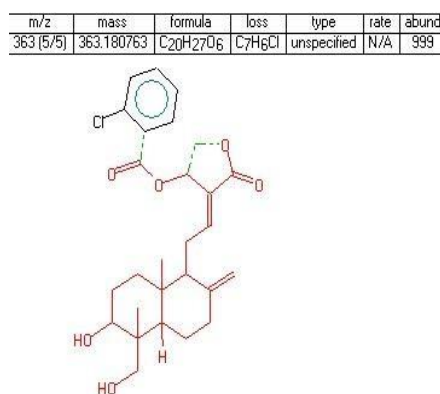
a. Data MS dari software MS Interpreter 2.0

Bilangan berat molekul yang muncul pada alat MS bukanlah berat molekul ester yang diinginkan, karena berat molekul ester yang diharapkan yaitu 489 g/mol. Tetapi bilangan yang muncul ternyata lebih kecil dari berat molekul ester yaitu 363,42 g/mol berarti dari keseluruhan molekul ester yang terbentuk yang terdeteksi oleh alat MS ini tidak seluruhnya molekul tersebut tetapi pecahannya saja sebesar 363,42 g/mol. Artinya terjadi pemecahan molekul (fragmentasi).

Untuk membuktikan seperti apa pola fragmentasinya sehingga didapatkan bilangan 363,42 g/mol yang terdapat pada grafik MS tersebut, maka digunakan bantuan dari *software MS Interpreter 2.0*. menyajikan beberapa kemungkinan fragmentasi yang terjadi. Yang harus diperhatikan pada *software* ini yaitu dari *abund* (kelimpahan), karena kelimpahannya besar dengan pembesaran skala (0-1000) sehingga dicari *abund* yang maksimal pada *software* ini yaitu 999. Selain itu yang harus diperhatikan yaitu pola pemutusan yang wajar atau tidak. Jika pemutusannya didekat ikatan rangkap maka itu adalah fragmentasi yang kemungkinan wajar karena satu garis ikatan terbentuk dari

2 ikatan kovalen, jadi jika putus masing- masing didekatnya ada ikatan rangkap maka elektron sunyi yang tidak berpasangan ini atau radikal bisa didelokalisasi (dipindahkan didalam ikatan rangkap tersebut).

Dari ke-5 hasil MS produk reaksi (ester), yang memungkinkan bahwa reaksi sudah memberikan produk yang diinginkan terlihat pada hasil MS pada Gambar 7. Pada gambar tersebut, posisi atom karbon diapit oleh atom-atom elektronegatif yaitu atom oksigen (O) sehingga atom oksigen menarik atom karbon kearahnya menyebabkan elektron yang ada di atom karbon tertarik kearah atom oksigen tersebut. Sehingga kepadatan elektron atom karbon di daerah ini berkurang dalam keadaan miskin elektron (δ^+). Ketika ditembakkan dengan MS maka ikatan yang berada didaerah sini gampang terputus.



Gambar 7. Pola Fragmentasi Data Software MS Interpreter 2.0

b. Disikloheksil urea (DCU)

Senyawa N,N disikloheksilkarbodiimida (DCC) merupakan senyawa yang berfungsi mengaktifkan gugus karboksilat menjadi suatu agen pengasilasi yang reaktif. Gugus aktif senyawa ini adalah gugus imida dari isourea ($-N=C=N-$) yang mengandung atom pusat karbon yang kekurangan elektron setelah bereaksi dengan proton dari asam karboksilat sehingga sangat mudah diserang oleh suatu nukleofilik dan membentuk asil isourea. Gugus asil isourea ini sangat reaktif karena mampu memecah ikatan asil-oksigen dan mengubah ikatan rangkap karbo-nitrogen dari iso urea menjadi gugus karbonil yang lebih stabil. Pada akhir reaksi terbentuk disikloheksil urea (DCU) sebagai hasil sampingan penggunaan N,N disikloheksilkarbodiimida (DCC). Senyawa N,N-disikloheksilkarbodiimida (DCC) pada penelitian ini bertindak sebagai aktivator. Asam karboksilat jika bertemu langsung dengan alkohol akan sulit bereaksi menjadi ester, untuk itu diberikan aktivator yaitu senyawa N,N-disikloheksilkarbodiimida (DCC).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah diuraikan dapat disimpulkan bahwa telah terjadi sintesis turunan senyawa andrografolida melalui reaksi esterifikasi dengan kondisi optimum dilakukan semalaman (*overnight*) pada suhu kamar (rt) dengan menggunakan senyawa N,N- disikloheksilkarbodiimida (DCC), senyawa N,N-4-dimetil amino piridin (DMAP), dan asam 2-klorobenzoat dengan pelarut diklorometana.

Saran

Untuk penelitian selanjutnya, hasil analisis senyawa turunan andrografolida ini dapat dilakukan dengan spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*).

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S. 2011. *Andrographis paniculata: A Review of Pharmacological Activities and Clinical Effects. Alternative Medicine Review. Vol: 16(1). P.66-77.*
- Chao, W.W. and Lin, B.F. 2010. *Isolation and Identification of Bioactive Compounds in Andrographis paniculata (Chuanxinlian), Chinese Medicine Journal.5:1-15.*
- Depkes RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. P.126-127.
- Harijanto, PN.2010. *Gejala klinik malaria Ringan. Dalam: Harijanto PN, editor. Malaria dari Molekuler ke Klinis.Edisi ke-2*. Jakarta. EGC.
- Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Kenangalem E, Wariker E, Maristela L, *et al.* 2008. *Malarial morbidity in papua Indonesia, an area with multidrug resistant Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum. Malaria journal. 7:148-60.*
- Kementerian Kesehatan RI, 2014. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI.
- Noviyanti R. 2011. *Patogenesis molekuler Plasmodium falciparum: Kajian Gen Parasit yang berkaitan dengan virulensi. Dalam: Soedarto, editor. Malaria*. Surabaya: Sagung Seto.
- Soedarto, 2011. *Malaria*. Sagung Seto: Jakarta.